

Актуальность Проблема сохранения здоровья и увеличения продолжительности жизни человека является наиболее приоритетной и отнесенной к категории государственной важности. Несомненно, обеспечение здорового образа жизни человека взаимосвязано с питанием. Регулярное употребление фруктов, овощей и ягод уменьшает риск развития некоторых заболеваний, в том числе, онкологических и сердечно-сосудистых. Снижению развития заболеваний способствует присутствие в их составе биологически активных веществ, физиологически функциональных пищевых ингредиентов - витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон, пребиотиков. Биологически активные вещества растительного происхождения приобретают определенный статус также в фармацевтике и парфюмерии. Однако, в производстве биологически активных веществ растительного происхождения наблюдается недостаток сырьевых ресурсов при неуклонном росте их спроса. В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой и парфюмерной промышленности, выделяют из тканей возделываемых или дикорастущих растений, часто принадлежащих к редким видам. Альтернативным источником получения экологически и физиологически безопасных биологически активных веществ является культура растительных клеток и тканей [1, 2]. Культуры клеток и тканей, полученные *in vitro*, как и клетки интактного растения, могут синтезировать вторичные метаболиты (ВМ) и все шире используются в фитобиотехнологии. В связи с этим актуальным является поиск новых сырьевых источников и способов получения этих веществ из известного многообразия растительного мира. Применение клеточной технологии при синтезе лекарственных средств Содержание БАВ в различных частях растения неодинаково. Колебания могут быть весьма значительными, например, в листьях, как правило, действующих веществ больше, чем в стеблях. Поэтому в зависимости от того, каких частей (листьев или стеблей) взято больше для определения, результаты будут отличаться. Каждое лекарственное растение является источником необходимых для человека веществ. Например, календула лекарственная (*Calendula officinalis*) широко культивируется как декоративное растение. В лекарственных целях возделываются сорта с махровыми формами цветов оранжево-красного цвета, так как содержание каротина в них в два раза больше, чем в бледно окрашенных цветах. Цветочные корзинки содержат каротиноиды (до 3,2 мг%), эфирные масла (около 0,02 %), дубильные вещества (до 4,45 %), витамин С, флавоноиды (до 3,5 %) и другие вещества [3]. Календула применяется в основном в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, антисептического, желчегонного, противоракового средства [4]. Широкий спектр биологической активности и «мягкость» действия являются основными преимуществами фармакологических препаратов из природного растительного сырья. На сегодняшний день из растений получают более трети всех лекарственных субстанций, используемых в

медицинской практике. Структура многих из них настолько сложна, что растения еще долго будут их единственным источником [5]. В настоящее время известно более 100000 ВМ (вторичные метаболиты), продуцируемых растениями. Многие из них являются практически важными продуктами. При этом в биосфере насчитывается 6 млн. индивидуальных химических соединений, которые тем или иным путем могут попадать и накапливаться в растениях [6]. В таблице 1 указаны наиболее употребляемые лекарственные вещества, получаемые из растений [7]. Лекарственные вещества могут быть получены различными химическими и биотехнологическими способами из растительного, животного или минерального сырья; успехи науки химии позволяют достичь при этом высокой степени чистоты конечного продукта. Однако неумеренное поступление биологически активных веществ может нанести существенный вред здоровью, если будет нарушен баланс между питательными компонентами, в которых остро нуждается организм человека. Таблица 1 - Наиболее употребляемые лекарственные вещества, получаемые из растений

Активность	Растение-источник
Стероиды	из диосгенина
Противозачаточные средства	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Кодеин	<i>Papaver somniferum</i>
Атропин	Антихолинэргическое <i>Atropa belladonna</i> L.
Резерпин	Снижающее давление <i>Rauwolfia serpentina</i> L.
Гиосциамин	Антихолинэргическое <i>Hyoscyamus niger</i> L.
Дигоксин	Тонизирующее сердечную деятельность <i>Digitalis lanata</i> L.
Скополамин	Антихолинэргическое <i>Datura metel</i> L.
Дигитоксин	Сердечно-сосудистые <i>Digitalis purpurea</i> L.
Пилокарпин	Холинэргическое <i>Pilocarpus jaborandi</i>
Хинидин	Антималарийное <i>Cinchona ledgeriana</i>

Только в условиях полного сохранения в рационе необходимых пищевых ингредиентов индивидууму удастся удовлетворить потребность в энергетической подпитке и обеспечить нормальное протекание обменных процессов в организме [8]. Получены каллусные и суспензионные культуры лекарственных растений: эхинацеи пурпурной, шалфея лекарственного, расторопши пятнистой, сирени обыкновенной, каллизии душистой, пажитника греческого, катарантуса розового, барвинка малого и др. Эти растения известны как иммуностимуляторы (Эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea*)); как вещества, обладающие антиоксидантным, нейропротекторным, противирусным, гепатопротекторным действиями (шалфей лекарственный (*Salvia officinalis*)); как вещества, обладающие выраженными гепатопротекторными свойствами (Расторопша пятнистая (*Silybum marianum*)) и другие [9]. Использование культуры клеток растений имеет ряд преимуществ: экологическая чистота производства культуры клеток, гарантированное производство биомассы независимо от сезона и погодных условий, отсутствие в биомассе вредных добавок. С 1993 и в России разрешен к применению лекарственный препарат «Paclitaxel», действующим началом которого является паклитаксел (коммерческий синоним этого соединения - таксол). Этот препарат главным образом используется для лечения

метастатического рака яичников, метастатического рака молочной железы и рака легкого, а также в терапии второй линии от СПИДа, связанной с саркомой Капоши. Серьезной проблемой в его получении является низкая концентрация (0,001 - 0,05 %) таксола даже в наиболее продуктивных видах, таких как *T. brevifolia*. Принимая во внимание эти факты, существует необходимость найти другие источники таксола. Альтернативным источником таксоидов может служить культура растительных клеток. В ИФР РАН получен ряд культур клеток разных видов *Taxus*, однако исследование на предмет содержания таксоидов не проведено. Проведен сравнительный анализ биосинтетических характеристик шести линий клеток суспензионной культуры *T. baccata*. Проанализировано 6 линий суспензионной культуры клеток, которые отличались между собой по гормональному составу сред и наличию или отсутствию поливинилпирролидона (ПВП): 106, 106 ПВП - α НУК (2 мг/л), БАП (0,3 мг/л); 107, 107 ПВП - пиклорам (2 мг/л), БАП (0,3 мг/л); 108, 108 ПВП - 2,4-D (1 мг/л), кинетин (0,3 мг/л). Анализ показал наличие пика с временем удерживания, близким к паклитакселу в линиях 106 ПВП, - 21,041 мин.; 107 - 21,043 мин., менее выраженный пик у линии 107 ПВП - 21,045 мин.; в линиях 108 и 108ПВП выраженных пиков с интересующими временами удерживания обнаружено не было. Пик, близкий к баккату III, был также определен только в пробе линии 106 (4,961 мин.). Выводы о наличии или отсутствии исследуемых соединений делали, основываясь на данных ВЭЖХ смеси стандартов баккату III и паклитаксела и совпадении времен удерживания: для баккату III - 4,954 мин., для паклитаксела - 20,993 мин. Таким образом, для дальнейшей работы по оптимизации ростовых и биосинтетических показателей культуры клеток *T. baccata* применимы 4 линии из 6, выращиваемые с добавлением таких фитогормонов, как α НУК, БАП, пиклорам. Наличие или отсутствие ПВП в среде культивирования не влияло на содержание таксоидов в культуре клеток. Для стандартизации и оценки качества БАВ, теоретического обоснования их применения эффективны методы ядерного магнитного резонанса [10]. В лекарственном сырье наряду с действующими веществами содержатся и так называемые сопутствующие вещества, которые также могут обладать фармакологической активностью. Довольно часто сопутствующие вещества влияют на действие БАВ, потенцируя или ингибируя их фармакологический эффект. Качественный состав БАВ может быть различным в разных органах у одного и того же растения, это зависит от сроков заготовки лекарственного растительного сырья. Биологически активные вещества неравномерно распределяются по органам и тканям растений с преимущественной локализацией в определенных органах. На образование и накопление БАВ влияет и возраст растений. Это обязательно учитывают при культивировании растений [11]. Как альтернативные источники БАВ растительного происхождения клеточные культуры обладают следующими преимуществами: получение экологически чистых продуктов независимо от

климата, сезона, погоды; создание клеточных линий-сверхпродуцентов путем генетически манипуляций; сохранение пула генов редких и исчезающих растений-продуцентов; - возможность оптимизировать и стандартизировать условия выращивания; возможность автоматизации процессов [12]. Благодаря усилиям исследователей накоплено ценная информация о способности культивируемых растительных клеток синтезировать многие традиционные экономически важные продукты: терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, необычные пептиды и специализированные белки, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, воски, витамины. Также доказана возможность культур клеток осуществлять биотрансформацию, то есть синтезировать некоторые БАВ из дешевых и доступных их предшественников. Эти «полупродукты» вторичных метаболитов не могут быть преобразованы химическим или микробиологическим путем, и только благодаря активности ферментов клеток растений в культуре происходит их превращение в ценный конечный продукт. Особенности культивирования клеток тканей растений. Стадия ферментации является основной стадией в биотехнологическом процессе, так как в ее ходе происходит взаимодействие продуцента с субстратом и образование целевых продуктов (биомасс, эндо- и экзопродуктов). Эта стадия осуществляется в биохимическом реакторе и может быть организована в зависимости от особенностей используемого продуцента и требований к типу и качеству конечного продукта различными способами. Ферментация может происходить в строго асептических условиях и без соблюдения правил стерильности (так называемая «незащищенная» ферментация); на жидких и на твердых средах; анаэробно и аэробно. Аэробная ферментация, в свою очередь, может протекать поверхностно или глубинно (во всей толще питательной среды). Культивирование биологических объектов может осуществляться в периодическом и проточном режимах, полунепрерывно с подпиткой субстратом. При периодическом способе культивирования биореактор заполняется исходной питательной средой и инокулятом микроорганизмов. В течение определенного периода времени в аппарате происходит взаимодействие микроорганизмов и субстрат сопровождающееся образованием в культуре продукта ($X + S \rightarrow P$). Биохимические превращения в этом аппарате продолжаются от десятков часов до нескольких суток. Регуляция условий внутри ферментера - важнейшая задача периодического культивирования клеток тканей растений. В ходе периодической ферментации выращиваемая культура проходит ряд последовательных стадий: лаг-фазу, экспоненциальную, замедления роста, стационарную и отмирания. При этом происходят существенные изменения физиологического состояния биообъекта, а также ряда параметров среды. Целевые продукты образуются в экспоненциальной (первичные метаболиты - ферменты, аминокислоты, витамины) и стационарной (вторичные метаболиты -

антибиотики) фазах. Поэтому в зависимости от целей биотехнологического процесса в современных промышленных процессах применяют принцип дифференцированных режимов культивирования. В результате этого создаются условия для максимальной продукции того или иного целевого продукта. Периодически биореактор опорожняют, производят выделение и очистку продукта, и начинается новый цикл [13]. Ферментирование растительного сырья. В последние годы возросло число лекарственных препаратов и продуктов питания, полученных с использованием ферментированного растительного сырья. Ферментирование представляет собой биохимический процесс, катализируемый собственными ферментами растения, при котором органические вещества растения превращаются в другие химические соединения с выделением химической энергии [14]. Ферментированные продукты лучше сохраняются и, как показали исследования, содержат, помимо питательных веществ, антибактериальные и противовирусные соединения. Есть результаты исследований подтверждающих, что употребление подобных продуктов может препятствовать развитию раковых заболеваний. Так, в настоящее время популярны ферментированные продукты из сои (например, пасты «мисо» и «темпе»; первая используется в традиционной японской кухне). Установлено, что у женщин, регулярно употребляющих эти продукты, существенно снижается риск заболевания раком молочной железы [15]. При ферментировании лекарственного растительного сырья происходят изменения состава биологически активных веществ, например клетчатки, гликозидов, флавоноидов и т.д. Ферментирование растительного сырья часто используется для увеличения выхода одних групп БАВ или для устранения других нежелательных соединений. При ферментировании гликозидов происходит деструкция с образованием свободного агликона, например у корней горечавки желтой. У некоторых видов лекарственного растительного сырья после ферментирования увеличивается выход эфирного масла (корневища ириса, корневища и корни пиона, корни хрена). Из свежих корней колюрии после ферментирования увеличивается выход эфирного масла до 1,5 % за счет образования эвгенола, а при ферментативном расщеплении гликозидов амигдалина, миндалонитрила или пруназина - в растениях косточковых плодовых пород образуется бензойный альдегид [17]. Другим примером служит получение дигитоксина из листьев наперстянки шерстистой. Предварительное ферментирование листьев увеличивает выход дигитоксина в 4 раза. С этой целью измельченные листья наперстянки замачивают в воде, имеющей температуру 37 - 40 °С, и оставляют при этой температуре на 40 - 48 часов. Превращения флавоноидов наблюдаются в ходе некоторых технологических процессов, в частности при ферментировании чая, производстве соков и пива. В работе [18] рассмотрены основные закономерности, наблюдающиеся при ферментативных реакциях окисления или восстановления флавоноидов. В результате этих процессов у природных

фенольных соединений проявляются более разнообразные виды биологической активности. Экспериментально показано, что хиноны и хинонметиды, стабильные продукты автоокисления полифенолов, а также ряд короткоживущих интермедиатов обладают высокой противоопухолевой активностью [19]. Ферментированием растений возможно удовлетворение потребности человека в питательных веществах. Выражение каждое лекарство должно быть пищей для организма, а каждая пища - лекарством всегда было злободневным. Обмен веществ и энергии может нарушаться у человека из-за недостатка в рационе некоторых веществ, которые организм человека сам не способен синтезировать и получает их с пищей. Много таких веществ относят к классу витаминов. Недостаток витаминов в организме человека компенсируется растениями, которые содержат достаточное количество необходимых питательных веществ. Иногда достаточным может быть введение в рацион человека не самого витамина, а его предшественника, в частности, вместо провитамина А - β -каротина [20]. Выделение биологически активных веществ из растительного сырья. На территориях многих регионов России произрастает около 1000 видов растений, из которых, по меньшей мере, 350 являются полезными и свыше 100 применяются в медицине. Кроме того, повсеместно распространены сорняки, лечебное значение которых с каждым годом открывает новые перспективы. Все эти лекарственные растения содержат биологически активные вещества, сочетание которых и определяет фармакологическое действие на организм человека. Это алкалоиды (азотсодержащие щелочные органические соединения), гликозиды (органические вещества, молекулы которых состоят из углеводов и неуглеводного компонента), флавоноиды (красящие гликозиды), сапонины (гликозиды, дающие с водой пену), пектины (органические вещества, по своему химическому строению близкие к камедям и слизям), стеарины (полициклические твердые спирты), танины (дубильные вещества), сахара (глюкоза, фруктоза и др.), органические кислоты (яблочная, лимонная, винная и др.), клетчатка, эфирные масла, микроэлементы (калий, натрий, магний, железо и др.), витамины (С, В, Р, РР, А и др.), и другие. Выделение БАВ из растительного сырья, их разделение и очистка представляют собой сложную задачу. Несмотря на многообразие видов сырья, физических и химических свойств извлекаемых соединений, технология их выделения состоит в основном из следующих стадий: измельчение исходного сырья, приведение его в тесный контакт с растворителем, отделение экстракта от сырья, удаление и регенерация растворителя из экстракта и исходного сырья, выделение и очистка биологически активного вещества [21]. Экстракция природных веществ из растительных тканей может быть осуществлена либо извлечением комплекса содержащихся в них соединений с последующим разделением на отдельные компоненты, либо последовательной экстракцией отдельных соединений или

классов соединений. Обычно в растениях содержится несколько биогенетически связанных соединений, сходных по химической структуре и свойствам, что значительно усложняет задачу. Вот почему чаще всего извлекается сумма БАВ с примесью других сопутствующих природных соединений, содержащихся в исходном сырье. При выделении БАВ необходимо учитывать возможность их разложения под влиянием растворителей, температуры, условий выполнения экстракции, а также воздействия ферментов, содержащихся в растительном сырье. Лечебное действие многих видов лекарственных растений, применяемых в настоящее время в народной медицине, связано с наличием в них различных биологически активных веществ, которые при поступлении в организм животных и человека проявляют нужный физиологический эффект и оказывают терапевтическое действие. Они называются действующими веществами, имеют разнообразный состав и относятся к различным классам химических соединений. К числу основных действующих веществ относятся алкалоиды, сердечные кумарины, флавоноиды, хинон, смолы, дубильные вещества, а также эфирные масла, состоящие из смеси различных веществ, и витамины [22, 23, 24]. Выводы Прогресс в фармакологии, пищевой и парфюмерной промышленности взаимосвязан с дальнейшим развитием методов фитобиотехнологии и их освоением на практике.